Aus der Hals-, Nasen- und Ohren-Universitätsklinik und
Poliklinik Würzburg

Direktor: Professor Dr.med. W. Kley

AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR REGENERATION DER WACHSENDEN TRACHEA NACH PROLIFERATIONSREIZ BEI 3- WÖCHIGEN RATTEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Johannes A. Hupfer

aus Wullenstetten,

Kreis Neu-Ulm

Würzburg, den 18. August 1980

1981

Aus der Hals-, Nasen- und Ohren-Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg

Direktor: Professor Dr.med. W. Kley

AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR REGENERATION DER WACHSENDEN TRACHEA NACH PROLIFERATIONSREIZ BEI 3- WÖCHIGEN RATTEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Johannes A. Hupfer

aus Wullenstetten,
Kreis Neu-Ulm

Würzburg, den 18. August 1980

Referent:	Priv. Doz. Dr.med. Dr.med.habil. K. Foet
Korreferent:	Professor Dr.med. W. Kley
Dekan:	Professor Dr.med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 26.2.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543527_0075

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

1. EINLEITUNG 1

2. LITERATURÜBERSICHT 3

3. ANATOMIE DER TRACHEA 5

4. MATERIAL UND METHODE 7

4.1. Tierstamm, Haltung und Ernährung der Tiere 7

4.2. Verwendetes radioaktives Material 7

4.3. Durchführung der Versuche 8

4.3.1. Operationsmethode 8

4.3.2. Applikation und Dosierung von ^{3}H-Thymidin 9

4.3.3. Tötung und Sektion der Versuchstiere 9

4.3.4. Fixation der Trachea 11

4.4. Histologische Aufarbeitung 11

4.5. Färbungen 12

4.6. Herstellung der Autoradiogramme 13

4.7. Auswertung der Autoradiogramme 14

4.7.1. Feststellung des Nulleffektes 14

4.7.2. Bestimmung des Markierungsindex 14

4.7.3. Methode der Zellzählung 15

5. ZELLKINETISCHE BEFUNDE 16

5.1. Auswertung der histologischen Präparate 16

5.2. Markierungsindex als Funktion der Zeit nach Proliferationsreiz 16

Seite

5.2.1. Bindegewebe 16
5.2.2. Epithel 20
5.2.3. Tunica propria 24
5.2.4. Äußeres Perichondrium 27
5.2.5. Inneres Perichondrium 31
5.2.6. Knorpel 33

6. ZUSAMMENFASSUNG DER BEFUNDE 37

7. DISKUSSION DER BEFUNDE 40

7.1. Zellproliferation des Trachealringes unter physiologischen Wachstumsbedingungen 40

7.2. Quantitativer und temporärer Verlauf des Markierungsindex nach Proliferationsreiz 41

7.3. Regeneration des Trachealringes 43

8. ZUSAMMENFASSUNG 46

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S I-VIII

L E B E N S L A U F

1. E I N L E I T U N G

Chirurgische Eingriffe an der Trachea haben in den letzten Jahren zugenommen, wie aus zahlreichen experimentellen und klinischen Publikationen zu entnehmen ist (ABOULKER et al., BANFAI, BECK u. LANGE, CONLEY, DEDO, DENECKE, FLEMMING u. HOMMERICH, GRILLO, ILBERG, KLEINASSER, KUP, MAEDA u. GRILLO, MEYER, NAUMANN, NAUMANN et al., NORDIN, SØRENSEN et al., SCHLOSSHAUER, WEERDA et al., ZEHM, ZENKER). Diese Zunahme korreliert mit dem gehäuften Auftreten von Trachealstenosen nach Langzeitintubation auf Intensivstationen und Reanimationszentren. Es gibt zahlreiche Hinweise über rekonstruktive Maßnahmen bei Trachealstenosen. (LANGE, CONLEY, DENECKE, FARRIOR, GOLLMITZ, GRILLO, HALTUNEN, KEIM, KLEINASSER, KORNMESSER, KUP, LESOINE, MEYER, MOSER, NAUMANN, ROB et al., SPERLING, SCHLOSSHAUER, SCHOBEL, ZEHM, ZENKER).

Alle angegebenen operativen Methoden beziehen sich auf die Behandlung erwachsener Trachealstenosen. Entsprechend dem gehäuften Vorkommen erwachsener Trachealstenosen ist jedoch auch ein Anstieg kindlicher Trachealstenosen zu verzeichnen. Hinweise über rekonstruktive Maßnahmen bei kindlichen Trachealstenosen, d.h. an der noch wachsenden Trachea, sind jedoch vereinzelt (CONLEY, DENECKE, FLEMMING, GOLLMITZ, GRAHNE, GRILLO, KLEINASSER, KORNMESSER, MEYER, SCHLOSSHAUER, SCHOSTOCK, ZEHM).

Langzeitbeobachtungen operativ angegangener kindlicher Trachealstenosen fehlen in der Literatur vollständig. So ist nicht bekannt, ob operative Eingriffe an der jugendlichen Trachea, die zwangsläufig zu Defekten des Knorpelringes führen, einen Wachstumsstillstand des knorpeligen Trachealringes hervorrufen. Auch bestehen nur lückenhafte Erkenntnisse über die zellkinetische Regeneration der einzelnen histologischen Fraktionen des Trachealringes, wie Bindegewebe, Epithel, Tunica propria, Perichondrium und Knorpel nach Traumatisierung der wachsenden Trachea.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit soll daher sein, im Tierexperiment das REGENERATIONSVERMÖGEN der einzelnen histologischen Fraktionen des wachsenden Trachealringes nach Proliferationsreiz als Funktion der Zeit zu untersuchen.

2. L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T

In der Literatur fehlen Hinweise über den quantitativen und temporären Verlauf der Regeneration der einzelnen histologischen Fraktionen des Trachealringes, wie Epithel, Perichondrium, Tunica propria und Knorpel, nach einem iatrogenen Defekt.

MESSIER und LEBLOND bestimmten mit ^{3}H-Thymidin Markierung die physiologischen Wachstumsaktivitäten verschiedener Organgewebe, wie Lunge, Leber, Oesophagusepithel, Darmepithel und Zungenepithel bei adulten Ratten. Bei diesen Untersuchungen zeigte der Trachealknorpel, im Gegensatz zum Trachealepithel und adventiellem Bindegewebe, niedrigere Markierungsindices.

Das Wachstum des Nasenseptumknorpels wurde von KVINNSLAND bei 1 bis 28 Tage alten Ratten autoradiographisch untersucht. Dabei ergaben sich unterschiedliche Intensitäten der Zellproliferation, die der Autor auf den Einfluß von Wachstumshormonen zurückführt. BINDREITER, SCHUPPLER und STOCKINGER fanden bei der Analyse der Markierungsindices von 10 Tage alten Ratten eine, nur auf die basal gelegenen Zellagen beschränkte Teilungsfähigkeit des Trachealepithels. Bei den oberflächlich gelegenen Zellen konnte eine Teilung ausgeschlossen werden.

Ähnliche Ergebnisse autoradiographischer Untersuchungen zur Zellneubildungdrate im Respirationstrakt ergaben sich aus Angaben von MEYER zum GOTTESBERGE und KOBURG, SHORTER und BLENKINSOPP.

Über die Proliferation des traumatisierten Trachealepithels lassen sich einige Literaturangaben finden. GORDON und LANE berichten von überwiegend basalständigen Epithelmarkierungen nach Zerstörung oberflächlicher Epithelschichten. Nach vollständiger Entfernung des Trachealepithels bildet das noch vorhandene, an den Defektbereich sich anschließende

Epithel, ein metaplastisches Regenerat, in Form einer kubischen Epithelzellschicht.

Auch ILBERG beobachtete zunächst die Bildung eines provisorischen Epithels, dessen flache und niedrigzylindrische Zellen ihm ein metaplastisches Aussehen verleihen.

3. ANATOMIE DER TRACHEA

Bei der Ratte liegen dicht unter der Halshaut stark entwickelte Glandulae submandibulares, die in lockeres Bindegewebe eingehüllt sind. Dorsal und kaudal dieser Speicheldrüsen liegt die gerade Halsmuskulatur, die die Trachea scheidenförmig umgibt.

Vor dem Schildknorpel und den beiden obersten Trachealsegmenten liegt die Schilddrüse. Die Trachea wird arteriell von arkadenförmigen Ästen einer Anastomose zwischen der Arteria thyreoidea caudalis und der Arteria bronchialis versorgt, welche den Membranae intercartilagineae benachbart sind. Der venöse Abfluß erfolgt über gleichsinnig gebaute Venolen. Die gut erkennbaren Nervi recurrentes verlaufen unmittelbar lateral gemeinsam mit den Gefäßen (Abb.1).

Die Trachea selbst besteht aus 18 - 22 hufeisenförmigen hyalinen Knorpelspangen. Die menschliche Trachea besitzt zum Vergleich 16 - 2o Knorpelspangen.

Die Knorpel werden dorsal gegen den Oesophagus von Bindegewebe und glatten Muskelfasern zu einem Ring geschlossen. Dieser dorsale bindegewebige und muskuläre Abschluß heißt Paries membranaceus. Die Muskulatur ermöglicht Enger- u. Weiterstellen des Rohres. Die Knorpelspangen werden untereinander durch eine mit dem Perichondrium zusammenhängende Faserhaut verbunden, deren Segmente man als Membranae intercartilagineae bezeichnet. Die Lichtung der Trachea wird von Schleimhaut ausgekleidet, die aus mehrreihigem, Becherzellen enthaltendem Flimmerepithel und der Lamina propria besteht. Ein lockeres Bindegewebe umschließt als Adventitia die Oberfläche der Luftröhre. Der Knorpel selbst wird von einem inneren und äußeren Perichondrium umgeben.

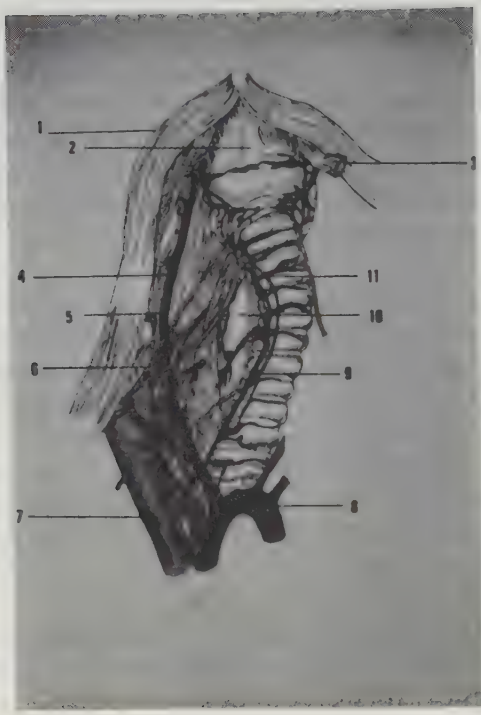


Abb. 1 : Anatomische Verhältnisse:

1 = M. sternohyoideus
2 = Larynx
3 = M. sternothyreoideus
4 = A. carotis communis
5 = N. vagus
6 = V. jugularis interna
7 = V. cava superior
8 = Truncus aortae
9 = A.thyreoidea caudalis
10 = Oesophagus
11 = N. recurrens

In Anlehnung an GREENE, E.: Anatomy of the Rat, Hafner Publishing Co, New York (1955)

4. MATERIAL UND METHODE

4.1. Tierstamm, Haltung und Ernährung der Tiere

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 30 Albino-Ratten vom Inzuchtstamm Wistar untersucht. (Eigene Nachzucht von Tieren des Zentralinstituts für Versuchstiere in Hannover-Linden).

Die Tiere, die ohne Berücksichtigung des Geschlechtes ausgewählt wurden, waren bei Versuchsbeginn 21 Tage alt. Die Albino-Ratten wurden unter konstanten Umweltbedingungen, wie Luftfeuchtigkeit von 50%, Raumtemperatur von23^{o}C und künstlichem Hell-Dunkelrhythmus (Licht von 6 bis 16 Uhr) gehalten. Die Ernährung erfolgte durch die Zuchtdiät Altromin - 1310 und Wasser ad libitum.

4.2. Radioaktives Präparat

Den Versuchstieren wurde das mit radioaktivem Wasserstoff markierte Nucleosid Thymidin, das aus Thymin und Desoxyribose besteht, injiziert. Dieser radioaktive Chromosomenbaustein wird von allen Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Injektion auf eine Mitose vorbereiten, in der Phase der Chromosomenreduplikation der S-Phase, in die DNA eingebaut. Das Präparat wurde von der New-England Nuclear Chemicals aus Boston bezogen. Die spezifische Aktivität betrug 6700 m Ci /m Mol. Die Lagerung der Substanz wurde im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4^{o}C vorgenommen. Vor Anwendung wurde ^{3}H-Thymidin dünnschichtchromatographisch auf seine radiochemische Reinheit überprüft.

4.3. Durchführung der Tierversuche

4.3.1. Operationsmethode

Als Anaesthetikum fand Ketanest^{R} in der handelsüblichen Konzentration von 10 mg/ml Anwendung. Um ein ausreichend tiefes Narkosestadium bis zu 30 Minuten Dauer zu erzielen, wurde den Tieren 0,4 ml Ketanest^{R} intraperitoneal injiziert.

Die Tiere wurden in überstreckter Rückenlage auf einer Korkplatte aufgespannt und mit Kodan-Spray im Hals- und Brustbereich desinfiziert (siehe Abb. 2).

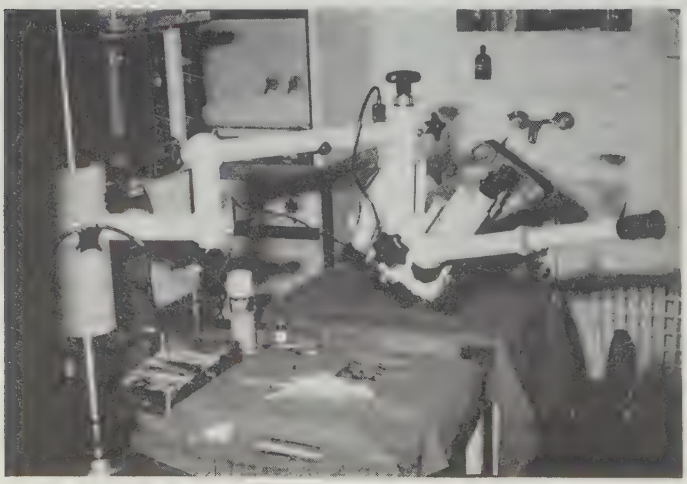


Abb. 2 : Arbeitsplatzanordnung

Mit einem Skalpell wurde durch einen medianen Längsschnitt die Haut und die subcutane Schicht durchtrennt. Im weiteren Verlauf des Eingriffes wurde mit einem Operationsmikroskop der Fa. Carl Zeiss mit Kamera (Zeiss-Ikon und Film "Kodak Ektachrome 200") gearbeitet. Die Muskulatur im Trachealbereich wurde mit einer chirurgischen Pinzette zur Seite

gedrängt. Nach Darstellung der Luftröhre wurden 1 bis 3 Trachealringe, 3 Spangen caudal des Ringknorpels, nach Art der Abbildung 3 reseziert. Bei Setzung der Fensterdefekte wurde darauf geachtet, daß Knorpelanteile, die unmittelbar an den Paries membranaceus angrenzten, erhalten blieben. Es erfolgte eine sorgfältige Blutstillung mit der bipolaren Koagulationspinzette. Anschließend wurde die praetracheale Muskulatur sorgfältig über den Fensterdefekt gelegt, um die Funktion des Atemrohres wieder zu gewährleisten. Der schichtweise Wundverschluß erfolgte mit Chromcat 6-O. Alle Tiere überstanden den Eingriff ohne größere Komplikationen. Ein postoperativer Stridor war nur vorübergehend nachweisbar.

4.3.2. Applikation und Dosierung von ^{3}H-Thymidin

Das ^{3}H-Thymidin wurde unmittelbar vor der Anwendung mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine Konzentration von 1000 µ Ci verdünnt. Diese Lösung wurde in einer 1 ml fassenden Tuberkulinspritze aufgezogen, und den Tieren zu definierten Zeitpunkten, und zwar jeweils 12 Stunden, 1 Tag, 2 Tage, 3 Tage und 6 Tage, eine Stunde vor der Tötung in einer Dosis von 5 µ Ci/g Körpergewicht subcutan unter die Rückenhaut injiziert.

4.3.3. Tötung und Sektion der Versuchstiere

Eine Stunde nach der Injektion erfolgte die Dekapitation der Tiere nach Betäubung in leichtem Ätherrausch. Unmittelbar danach wurde durch einen medianen Längsschnitt im Hals- und Brustbereich der vordere Thorax eröffnet. Nach Darstellung der Trachea in ihrem cervikalen und thorakalen Verlauf, erfolgte die makroskopische Inspektion des Defektbereiches. Bei allen Tieren zeigte sich weder eine entzündliche Reaktion, noch eine Vergrößerung der paratrachealen Lymphknoten. Auffallend war, daß das Tierkollektiv,

das 6 Tage nach Setzung des Fensterdefektes getötet wurde, einen vollständig bindegewebigen Verschluß des Fensterdefektes aufwies. Eine Stenosierung der Trachea im Defektbereich war nicht nachweisbar.

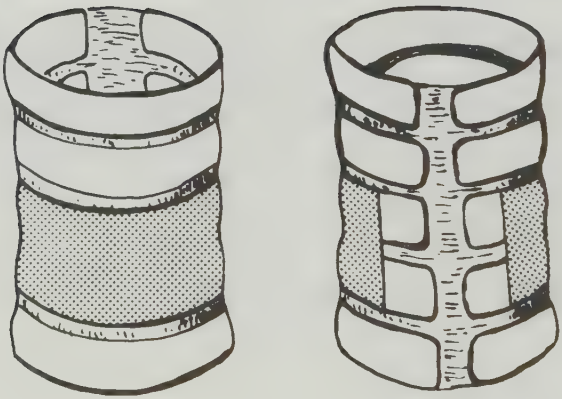


Abb. 3 : Art und Lokalisation des Fensterdefektes

4.3.4. Fixation der Trachea

Zur Fixation wurde die Trachea unmittelbar nach der Entnahme in Bouin'sche Lösung gelegt. Diese Lösung setzt sich aus 15 ml gesättigter wässriger Pikrinsäure, 5 ml Formaldehyd und 1 ml Eisessig zusammen.

4.4. Histologische Aufarbeitung

Nach 24-stündiger Fixation der Trachea in Bouin'scher Lösung wurde das Gewebe unter fließendes Leitungswasser, zur Beseitigung noch vorhandener Reste des Fixationsmittels gebracht. Danach konnte das Präparat in verflüssigtes Paraffin eingebettet werden. Dabei wurde versucht, die Trachea in gerader Form senkrecht in die Blöcke einzugießen. Dies war wegen der Kleinheit der Präparate äußerst schwierig.

Von den Paraffin-Blöcken wurden 5µ dicke Schnitte mit dem Mikrotom hergestellt. Dabei wurden nach 12 aufeinander folgenden Schnitten, die auf Objektträger aufgezogen wurden, jeweils 10 nachfolgende Schnitte verworfen.

Die Objektträger wurden anschließend auf einer Wärmeplatte, auf ungefähr 40^{o}C erwärmt. Die Schnitte wurden danach direkt in einen auf diesem Objektträger befindlichen Tropfen Streckwasser (10 ml Aceton, 40 ml Aqua dest., 0,5 ml Eiweissglyzerin) gebracht. Dabei entfalteten sich die Schnitte. Das überflüssige Streckwasser konnte danach abgegossen und die Objektträger zum Trocknen aufgestellt werden. Nach Trocknung erfolgte die Entparaffinierung über eine absteigende Alkoholreihe. Anschließend wurden die Schnitte wieder getrocknet und konnten nun mit der autoradiographischen Emulsion beschichtet werden.

4.5. Färbungen

Vier verschiedene Färbungen kamen insgesamt zur Anwendung.

a) Feulgen-Färbung (ROMEIS § 1192)

Bei allen histologischen Schnitten wurde vor Verarbeitung eine Feulgen-Färbung zur Kerndarstellung durchgeführt. (6 Minuten Hydrolyse in 1n HCL, Eintauchen in kaltes Wasser, 100 Minuten in Schiff's Reagenz, dreimaliges kurzes Eintauchen in SO_2-Wasser).

b) Hämalaun-Färbung nach P. MAYER (ROMEIS § 648)

Die Hämalaun-Färbung nach P. MAYER wurde zur Intensivierung der Feulgen-Kerndarstellung nach dem autoradiographischen Prozeß durch Photoemulsion hindurch hergestellt. Dabei sind die Kerne leuchtend blau, der Knorpel dunkelblau gefärbt.

c) Masson-Goldner-Färbung (ROMEIS § 1540)

Diese Färbung stellt eine Bindegewebsfärbung dar; die Kernfärbung erfolgt durch den Farbstoff Weigert's Eisenhämatoxylin, die Darstellung von Cytoplasma, Erythrozyten und Muskelgewebe durch Phosphomolybdänsäure - Orange G und die Färbung von Bindegewebe und Schleim durch Lichtgrün.

d) Alcianblau-Färbung (ARNOLD 39)

Nach Herstellung der Autoradiogramme wurde bei jedem 5. Objektträger zur Darstellung der Knorpelgrundsubstanz eine Färbung mit Alcianblau durchgeführt.

Bei allen Färbungen erfolgte die Differenzierung der Schnitte in Alkohol unter mikroskopischer Sicht solange, bis eine dezente, selektive Anfärbung der Kerne erreicht wurde. Die Differenzierung in Alkohol wurde wegen der mehr oder weniger starken Färbung der Gelatineschicht vorgenommen (B. SCHULTZE).

Alle Schnitte erhielten vor der autoradiographischen Bearbeitung zur selektiven Kerndarstellung eine Feulgen--Färbung. Zur Intensivierung der Feulgen-Kerndarstellung wurde bei einigen Präparaten nach dem autoradiographischen Prozeß die Hämalaun-Färbung nach P.MAYER vorgenommen. Dabei sind die Kerne leuchtend blau, der Knorpel dunkelblau gefärbt. Beide Färbungen verhalten sich gegenüber der photgraphischen Emulsion, mit der die Schnitte beschichtet sind, neutral und üben keinen Einfluß auf die qualitative und quantitative Wiedergabe der Silberkörner aus.

Nach Fertigstellung der Autoradiogramme wurde bei jedem fünften Objektträger eine Färbung mit Alcianblau (ARNOLD 39) zur Darstellung der Knorpelgrundsubstanz durchgeführt. Diese Färbung gelangte deshalb zur Anwendung, da sie in der Grenzzone zwischen Perichondrium und Knorpel eine Differenzierung zwischen den Perichondralzellen und den bereits Knorpelsubstanz bildenden Chondrozyten ermöglicht. Zur intensiven Darstellung des Bindegewebes, besonders im Defektbereich, führten wir bei einigen Schnitten eine Masson-Goldner-Färbung (ROMEIS § 1540) durch.

4.6. Herstellung der Autoradiogramme

Zur Herstellung der Autoradiogramme wurde die flüssige Emulsion Ilford K_2 von Ilford, London, verwandt. Diese Emulsion weist bei einer Korngröße von 0,2 micro-m eine große Empfindlichkeit und einen sehr geringen Nulleffekt aus. Das Aufbringen der Emulsion auf die Objektträger mußte in der Dunkelkammer vorgenommen werden. Zuerst wurden die Präparate mit 96%-igem Alkohol gereinigt, um ein einwandfreies Haften der Emulsion auf den Deckgläsern zu gewährleisten. Die bei 42°C im Wasserbad geschmolzene Emulsion wurde mit Aqua dest. im Verhältnis 2:1 verdünnt und sorgfältig durchgemischt. Die Objektträger wurden vorsichtig in die geschmolzene Emulsion eingetaucht und danach bei einer Raumtemperatur von 18°C zum Trocknen in einem Ständer schräg aufgestellt. Zur Exposition wurden die

getrockneten Präparate in lichtdichte Kästchen verpackt. Dabei wurde in jedes Kästchen, um eine gleichbleibende Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten, ein Trockenmittel (Drierite) beigegeben. Die gefüllten Expositionskästchen wurden im Kühlschrank bei $4^{o}C$ aufbewahrt.

Die Expositionszeit betrug 8 Tage. Anschließend erfolgte die Entwicklung der Autoradiogramme mit Amidolentwickler und die Fixierung in 30%-iger Lösung von Natrium-Thiosulfat. Nach 20-minütigem Wässern und Abspülen mit Aqua dest. erfolgte die Knorpel- und Bindegewebsfärbung.

4.7. Auswertung der Autoradiogramme

4.7.1. Feststellung des Nulleffektes

Der Nulleffekt fand während der Auswertung aller Autoradiogramme Berücksichtigung. Alle Silberkörner im Autoradiogramm, die nicht durch die Aktivität des in den Kern eingebauten ^{3}H-Thymidins hervorgerufen werden, müssen dem Nulleffekt zugerechnet werden. Ursachen für den Nulleffekt sind, neben der Herstellung, das zunehmende Alter der Photoemulsion. Eine Erhöhung des Nulleffektes erfolgt ferner bei falscher Lagerung der Emulsion, zu hohen Temperaturen, nahe und lange Einwirkung von Rotlicht in der Dunkelkammer, Einfluß kosmischer Strahlung und Einwirkung von Strahlung aus der Umgebung. Zur Bestimmung des Nulleffektes wurde bei 500 Zellen pro Tier und Gewebsart eine Zählung der Silberkörner über dem Kern durchgeführt. Die einzelnen Ergebnisse wurden in ein Histogramm eingetragen. Dabei ergab sich ein Nulleffekt von fünf Silberkörnern. Besaß eine Zelle mehr als fünf Körner pro Kern, so wurde sie als markiert betrachtet.

4.7.2. Bestimmung des Markierungsindex

Zur Bestimmung des Markierungsindex wurde die Anzahl der markierten Interphasenkerne und die Gesamtzahl aller erkennbaren Zellkerne gezählt. Der Markierungsindex versteht

sich als Prozentsatz der markierten Zellen, bezogen auf die gesamte Zellzahl (markierte plus nicht markierte Zellen). Somit wird dadurch die relative Zahl der sich zu der Versuchszeit in der DNS-Synthese-Phase befindlichen Zellen, die später in die Mitose eintreten, wiedergegeben. Er stellt somit ein Maß für die Proliferationstendenz einer Zellpopulation dar. Um die regenerativen Verhältnisse im Defektbereich mit den physiologischen Wachstumstendenzen vergleichen zu können, wurden Kontrollpräparate, die jeweils 2 bis 3 Trachealringe unterhalb des Defektbereiches lagen, angefertigt.

4.7.3. Methode der Zellzählung

Die Auswertung der Präparate erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung mit einem Ölimmersionsobjektiv von 100-facher und einem Okular von 10-facher Vergrößerung. Das Auszählen der einzelnen Zellen erfolgte mit einem Netzmikrometer, das im Okular eingesetzt war. Die Kantenlänge des quadratischen Mikrometers betrug 1cm.

In den einzelnen Sektoren wurde die Anzahl der markierten Kerne, sowie die Gesamtzahl der Zellen einer Gewebeart ausgezählt. Auf einer Zeichnung wurde die Lokalisation der einzelnen Sektoren eingetragen. Dies erleichterte später die genaue Analyse der Wachstumszonen der einzelnen Gewebefraktionen.

5. Z E L L K I N E T I S C H E B E F U N D E

5.1. Auswertung der histologischen Präparate

Das Verhalten des Trachealknorpels, sowie seiner angrenzenden Gewebearten, wurde durch den Einbau von intraperitoneal verabreichtem ^{3}H-TdR in die Zellkerne untersucht. Dabei wurde bei den Autoradiogrammen der Markierungsindex, die Anzahl der markierten sowie der unmarkierten Zellen gezählt, und der Prozentsatz markierter Zellen, bezogen auf alle Zellen, errechnet. Je nach Gewebeart und Versuchstier wurden dadurch zwischen 1500 und 9000 Zellen ausgezählt.

Um die Streuung der einzelnen Werte festzustellen, wurde neben dem arithmetischen Mittel der Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Der Mittelwert mit der Standardabweichung nach POISSON konnte der kleinen Zahlen wegen vernachlässigt werden.

5.2. Markierungsindex als Funktion der Zeit nach Proliferationsreiz

Die einzelnen Gewebearten der Trachea zeigten nach Setzung eines fensterartigen Defektes unterschiedliche Reaktionen. Dabei konnten an Hand des zeitlichen Verlaufs des Markierungsindex an den verschiedenen Gewebearten die nachfolgenden Beobachtungen gemacht werden.

5.2.1. Bindegewebe im Defektbereich

Als erste Regenerationsleistung des defekten Trachealringes findet ein bindegewebiger Verschluß des Fensterdefektes statt. In die vorliegende Auswertung gingen die sich im ventralen Bereich der Defektzone befindlichen Bindegewebszellen ein.

12 Stunden bzw. 1 Tag nach Setzung der Fensterdefekte war eine leukozytäre Infiltration im Defektbereich nachweisbar. Eine Differenzierung von Entzündungszellen und Bindegewebszellen war zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich. Nach 2 Tagen konnten bei einem Tier bereits vereinzelte Fibroplasten im Randgebiet des Defektes beobachtet werden, die in Zellnestern zwischen den leukozytären Infiltraten lagen. Am 3. Tag war der Defektbereich von einer Bindegewebsschicht verschlossen, in die auch neugebildete Kapillaren eingesproßt waren.

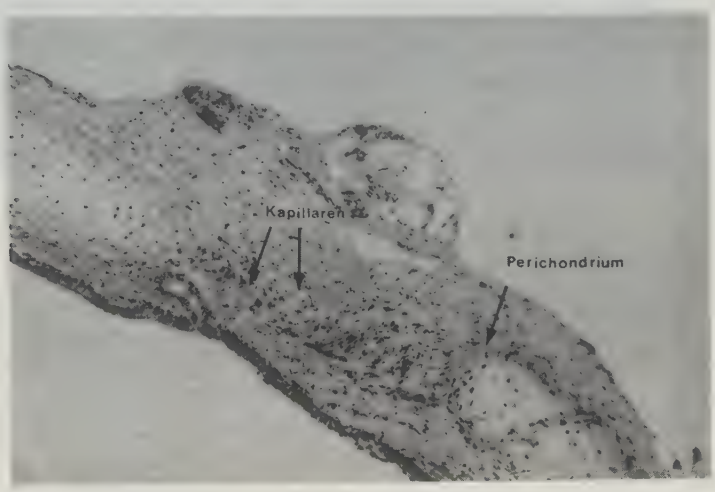


Abb. 4 : Verbindung der abgerundeten, von Perichondralzellen überzogenen Knorpelschnittstellen mit Bindegewebe; 6d. p. Op.; Masson-Goldner; 112-fach

Der Markierungsindex betrug dabei 22,53% ± 3,67%. Am 6. Tag wurden bei einem Index von 4,57% ± 1,24% kollagene Bindegewebsfasern beobachtet (siehe Tab. 1). Diese verbanden als zell- und gefäßarme bindegewebige Narbe die abgerundeten, mit Perichondralzellen überzogenen Knorpelzapfen (siehe Abb. 5).

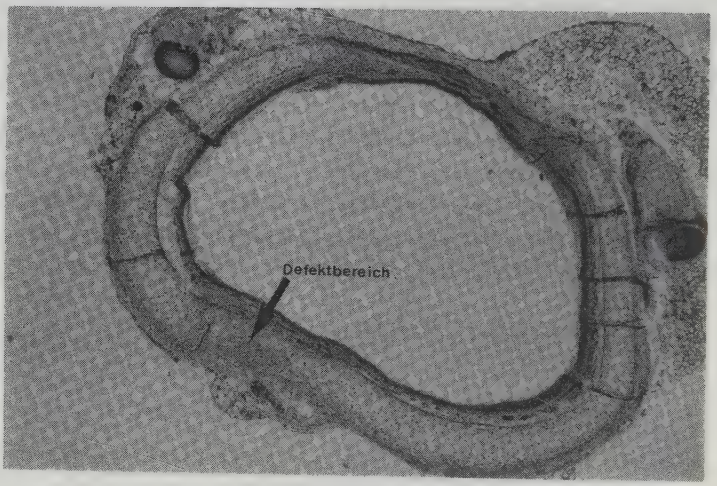


Abb. 5 : Übersichtsaufnahme des vernarbten Defektbereiches; 6 d. p. Op.; Masson-Goldner; 44,8-fach

12 Std.	1 d.	2 d.	3 d.	6 d.
—	—	21,64%	22,53% ± 3,67%	4,57% ± 1,24%

Tabelle 1 : Wertetabelle zu Abbildung 6

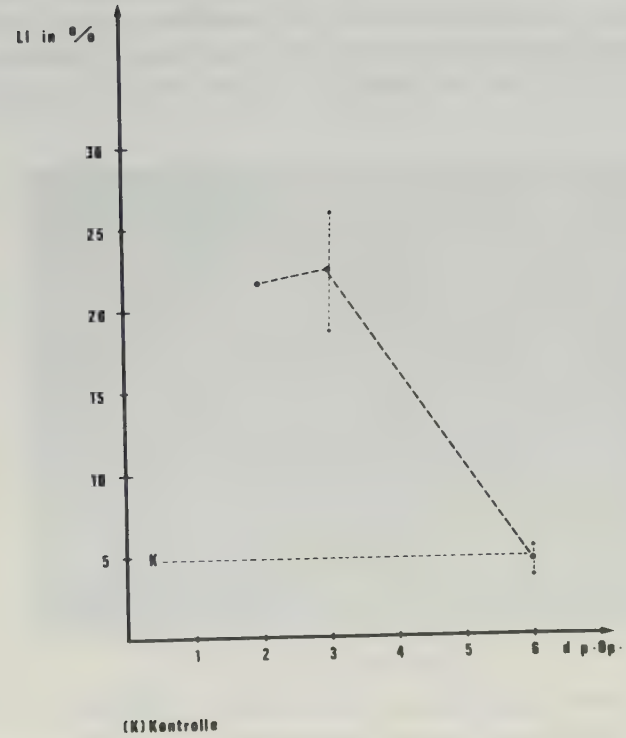


Abb. 6 : Arithmetisches Mittel der Markierungsindices des Bindegewebes mit dem Standardfehler des Mittelwertes

5.2.2. Epithel

Das Lumen der Trachea wird von einem hochprismatischen mehrreihigen Zylinderepithel mit ovalen Zellkernen ausgekleidet. Der Markierungsindex dieses physiologisch proliferierenden Epithels betrug 2,51%. Dabei waren überwiegend die basalständigen Zellkerne mit Silberkörnern markiert (siehe Abb. 7).

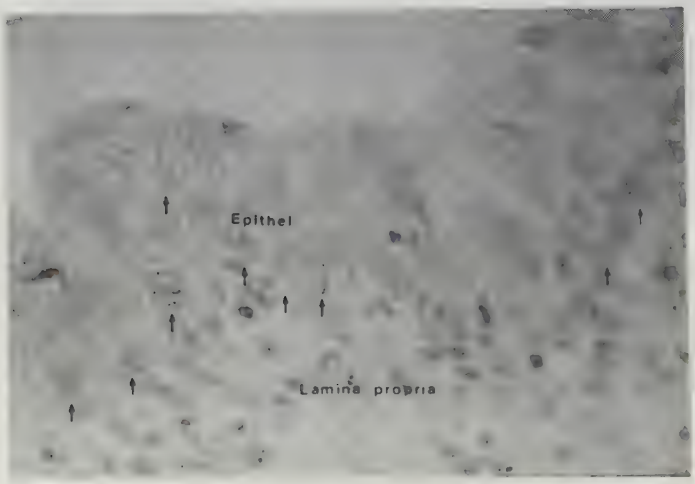


Abb. 7 : Hochprismatisches, mehrreihiges Zylinderepithel mit überwiegender Markierung der basalständigen Kerne; 6 d. p. Op.; Feulgen; 720-fach

Nach Proliferationsreiz bestand bereits 12 Stunden nach Operation ein Markierungsindex von 11,91% ± 1,04% (siehe Abb. 8). Eine vermehrte Anzahl von markierten Zellen, als Ausdruck der gesteigerten Regenerationsfähigkeit, befand sich im restlichen Epithel des verbliebenen Trachealareals und in den unmittelbar an diesen Bereich sich anschließenden kranialen und kaudalen Epithelzellagen.

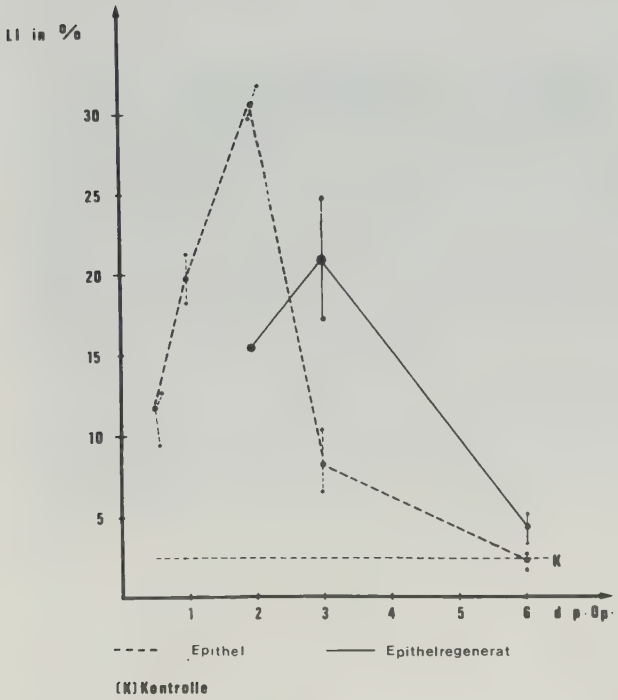


Abb. 8 : arithmetisches Mittel der Markierungsindices des Epithels und des Epithelregenerates mit dem Standardfehler des Mittelwertes

12 Std.	1 d.	2 d.	3 d.	6 d.
11,91% ± 1%	19,72% ± 2,12%	30,57% ± 1,4%	8,2% ± 1,96%	2,25% ± 0,06%

Tabelle 2 : Wertetabelle zu Abbildung 8

12 Std.	1 d.	2 d.	3 d.	6 d.
—	—	15,98%	21,8% ± 3,9%	4,55% ± 1,24%

Tabelle 3 : Wertetabelle zu Abbildung 8

1 Tag nach Defektsetzung erreichte der Markierungsindex 19,72% ± 2,12%. Die höchste Aktivität lag am 2. postoperativen Tag bei 30,57% ± 1,4%.

Da die Basalmembran als Grenzmembran zwischen Epithel und Lamina propria bei keinem Tier lichtmikroskopisch unter dem neugebildeten regenerierten Epithel im Defektbereich nachgewiesen werden konnte, wurde sie als zuverlässiges Kriterium zur exakten Trennung von Restepithel und Regeneratepithel herangezogen.

48 Stunden nach Defektsetzung waren teilweise bei allen Tieren an den Defekträndern kubisch geformte, vereinzelt liegende Epithelzellnester zu erkennen. Dieses Epithel war von beiden Seiten in den Operationsbereich eingewachsen. Der Markierungsindex dieses neuentstandenen metaplastischen Epithels lag bei 15,98% (siehe Tab. 3). Das sich an das Epithelregenerat nach dorsal anschließende Restepithel zeigte

in einem kleinen Abschnitt verstärkte Markierungen. 3 Tage nach Defektsetzung fiel der Index des verbliebenen Zylinderepithels auf 8,2% ± 1,96% ab. Der Defektbereich war vollständig von einer 2- bis 3-lagigen Epithelschicht ausgekleidet (siehe Abb. 9).

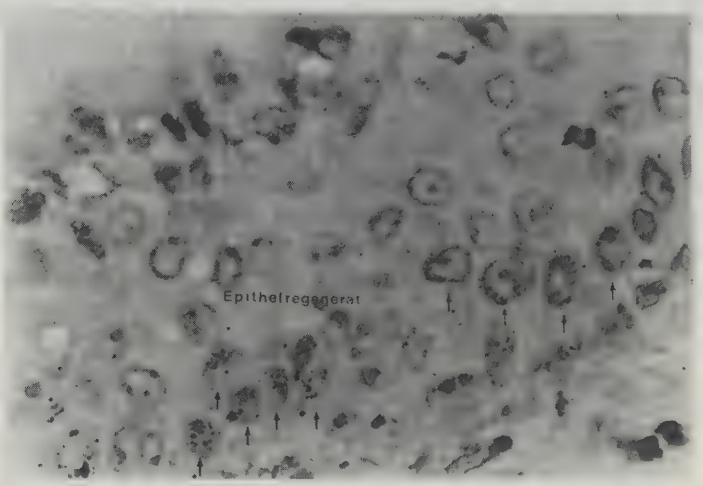


Abb. 9 : Epithelregenerat im Defektbereich; 3 d. p. Op.; Hämalaun; 720-fach

Dieser locker angeordnete Zellverband lag direkt dem Bindegewebe auf. Der Markierungsindex des Epithelregenerates erreichte dabei seinen höchsten Wert mit 21,8% ± 3,9%, lag aber deutlich unter dem Maximum von 30,57%, das vom Restepithel am 2. postoperativen Tag erreicht wurde. Am 6. Tag p. Op. erreichte das Regenerat einen Index von 4,55% ± 1,24%. Der Markierungsindex des nach Defektsetzung verbliebenen Epithelringes erreichte nur 2,25% ± 0,064%. Er lag mit diesem Wert auf der Höhe der Aktivität des physiologisch proliferierenden Epithels.

5.2.3. Tunica propria

Die Tunica propria stellt eine lockere Bindegewebsschicht dar. In ihr liegen Gefäße, Becherzellen und die seromukösen Glandulae tracheales.

Der physiologische Markierungsindex dieses Gewebes lag bei 1,5%. Von 1,37% ± 0,65% 12 Stunden post Op. stieg der Index steil an und erreichte seinen höchsten Wert nach 48 Stunden bei 17,4% ± 1,5% (siehe Abb. 10). Danach fiel er rasch ab und erreichte am 6. postoperativen Tag einen Wert von 2,34% ± 0,07%. Mit diesem Wert erreichte er dabei annähernd die Mitoseaktivität des physiologisch proliferierenden Gewebes. 6Tage nach Defektsetzung trat am Übergang der Tunica propria in das narbige Bindegewebe des Defektbereiches eine vermehrte Vaskularisation auf (siehe Abb. 11).

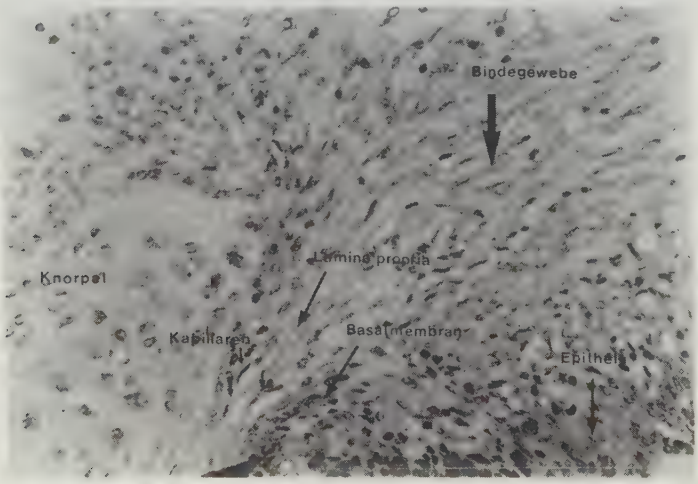


Abb. 11 : keilförmige Verdickung und vermehrte Vaskularisation der defektnahen Tunica propria; 6 d. p. Op.; Masson-Goldner; 420-fach

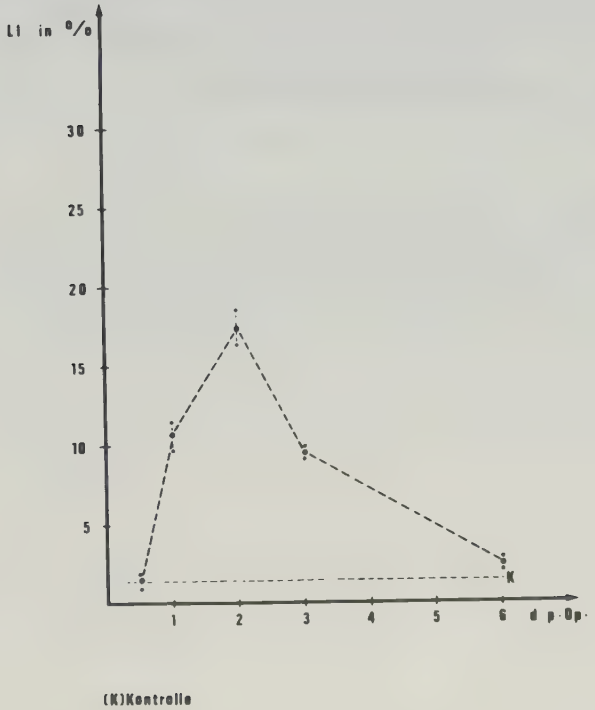


Abb. 10 : arithmetisches Mittel der Markierungsindices der Lamina propria mit dem Standardfehler des Mittelwertes

12 Std.	1 d.	2 d.	3 d.	6 d.
1,37% ± 0,65%	10,7% ± 1,18%	17,4% ± 1,5%	9,35% ± 0,27%	2,34% ± 0,07%

Tabelle 4 : Wertetabelle zu Abbildung 10

Mit zunehmender Annäherung der Lamina propria an die Schnittstellen der Defektzone erfolgte eine keilförmige Verdickung. Dabei wies der aufgeweitete, defektnahe Teil der Lamina propria bei der 48 Stunden post Op. getöteten Tiergruppe eine erhöhte Proliferationsaktivität auf.

5.2.4. Äußeres Perichondrium

Im jungen, wachsenden Trachealknorpel ist es schwierig, eine exakte Differenzierung zwischen dem inneren Perichondrium und dem Knorpel zu treffen. Um eine gleichbleibende Auswertung der histologischen Schnitte zu gewährleisten, wurden nur solche Zellen zum Perichondrium gerechnet, deren Zellkerne noch die typische, spindelförmige Gestalt der Fibrozyten und noch keine färberische Darstellung der Knorpelgrundsubstanz aufwiesen.

Der physiologische Markierungsindex des äußeren Perichondriums hatte einen Durchschnittswert von 0,32%. 12 Stunden nach Proliferationsreiz lag der Markierungsindex bei 0,34% $\pm$ 0,11% (siehe Abb. 12). Ein steiler Anstieg zum Maximum der ^{3}H-TdR-Anreicherung in den Zellkernen fand sich nach 48 Stunden. Dabei wurde ein Wert von 10,4% $\pm$ 1,06% erreicht. Danach fiel der Index relativ langsam ab, und erreichte 6 Tage nach der Defektsetzung einen Wert von 0,71% $\pm$ 0,22%.

Bei den 6 Tage nach Defektsetzung getöteten Tieren konnte beobachtet werden, daß die bei der Fensterung gerade durchtrennten Schnittflächen des Knorpels sich abgerundet hatten (siehe Abb. 13).

Von der verstärkten Mitoseaktivität war das gesamte Perichondrium im Defektbereich betroffen. Eine vermehrte Markierung wurde jedoch in Nähe der Schnittstellen festgestellt.

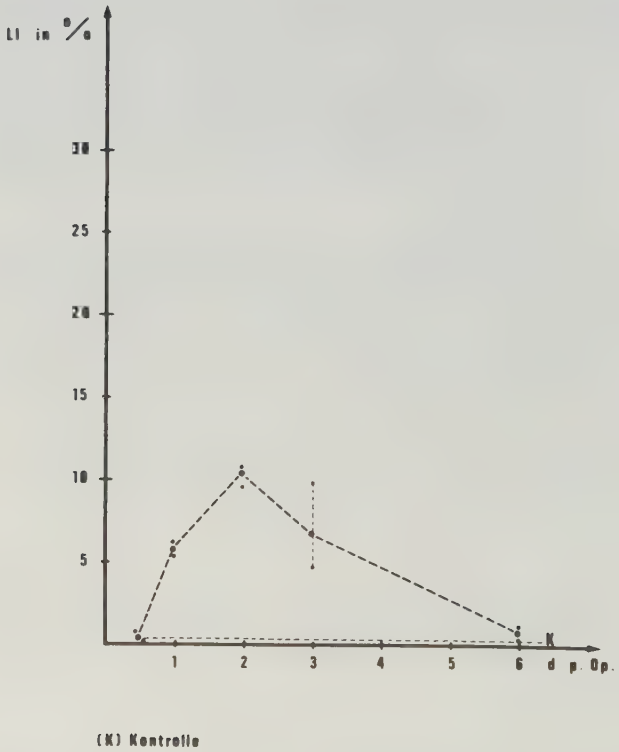


Abb. 12 : arithmetisches Mittel der Markierungsindices des äußeren Perichondriums mit dem Standardfehler des Mittelwertes

12 Std.	1 d.	2 d.	3 d.	6 d.
0,34% ± 0,11%	5,78% ± 0,15%	10,4% ± 1,06%	6,56% ± 2,85%	0,71% ± 0,22%

Tabelle 5 : Wertetabelle zu Abbildung 12

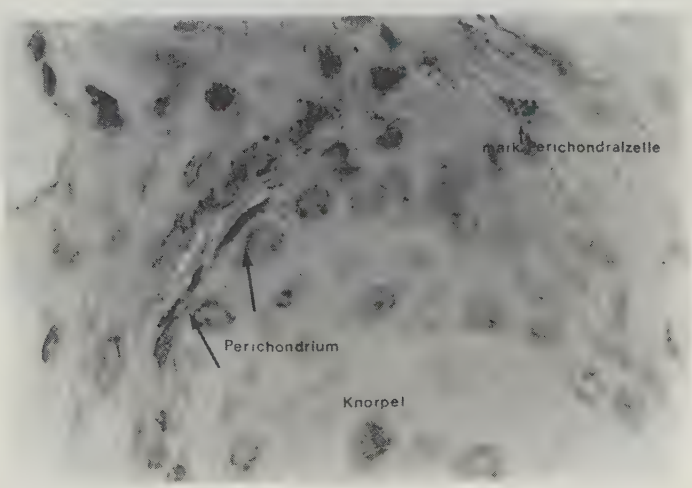


Abb. 13 : abgerundete Knorpelschnittfläche; 6 d. p. Op.; Feulgen; 720-fach

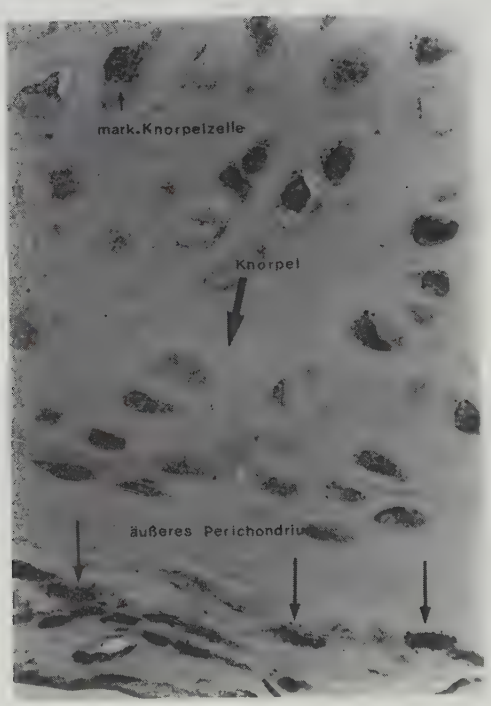


Abb. 14 : markierte Zellen in knorpelnahen Schichten des äußeren Perichondriums; 3 d. p. Op.; Feulgen; 920-fach

5.2.5. Inneres Perichondrium

Die Gewebeschicht des inneren Perichondriums ist,gegenüber der des äußeren Perichondriums, deutlich verschmälert. Auch hier wurden, wie beim äußeren Perichondrium, nur solche Zellen zum Perichondrium gerechnet, die Kerne mit spindelartiger Form aufwiesen und noch keine Knorpelgrundsubstanz zeigten.

Der physiologische Markierungsindex lag mit 0,46% annähernd in der Höhe von dem des äußeren Perichondriums. Der zeitliche Verlauf der Zellproliferation von äußerem und innerem Perichondrium entsprach in etwa dem der Lamina propria. Der Markierungsindex erreichte dabei,über 0,29% ± 0,4% nach 12 Stunden, sein Maximum nach 48 Stunden mit einem Wert von 16,4% ± 3,3% (siehe Abb. 15). Nach 6 Tagen lag er mit 1,34% ± 0,25% noch um das 4 1/2 fache höher, als nach 12 Stunden.

12 Std.	1 d.	2 d.	3 d.	6 d.
0,29% ± 0,4%	8,28% ± 2,6%	16,4% ± 3,3%	0,87% ± 0,55%	1,34% ± 0,25%

Tabelle 6 : Wertetabelle zu Abbildung 15

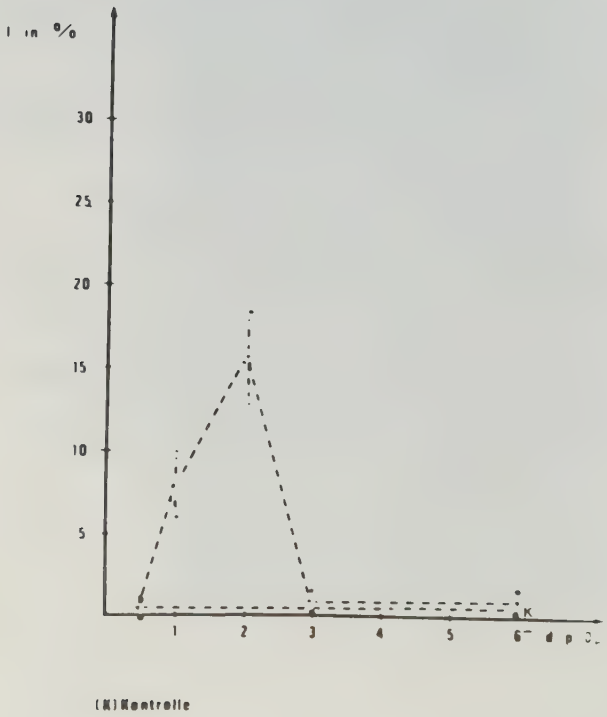


Abb. 15 : arithmetisches Mittel der Markierungsindices des inneren Perichondriums mit dem Standardfehler des Mittelwertes

5.2.6. Knorpel

Der Übergang vom Perichondrium zum Knorpel erfolgt kontinuierlich. Lagen die markierten Zellen noch als deutliche spindelförmige Kerne mit wenig zwischenliegender Alcianblaufärbung, also mit wenig interterritorialer Grundsubstanz, vor, wurden sie dem Perichondrium zugerechnet.

Die Knorpelspange des Trachealringes wurde in zwei Zonen eingeteilt, da sich bei der mikroskopischen Durchsicht der Präparate eine gehäuft auftretende Kernmarkierung in dem Knorpelareal zeigte, das sich direkt an den Paries membranaceus anschließt. Dieser Bereich gilt als Ort verstärkter Knorpelwachstumspotenz (FOET). Hier liegen die Chondrozyten dicht gedrängt und lassen mit Hilfe der Alcianblau-Färbung nur wenig interterritoriale Grundsubstanz erkennen (siehe Abb.16).

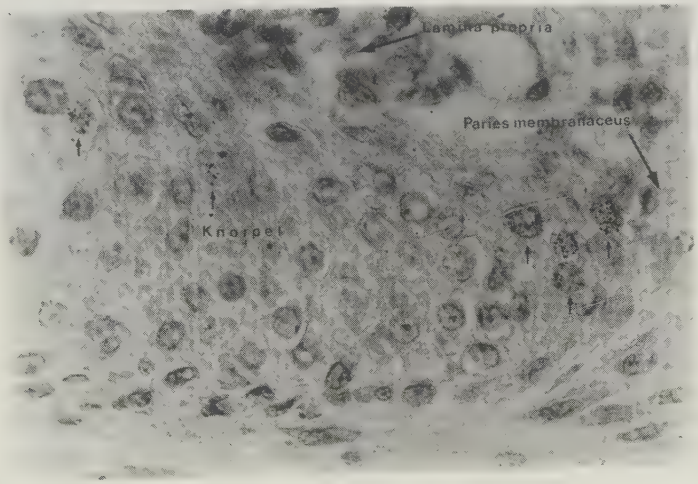


Abb. 16 : markierte Knorpelzellen am Paries membranaceus; 6 d. p.Op.; Alcianblau; 920-fach

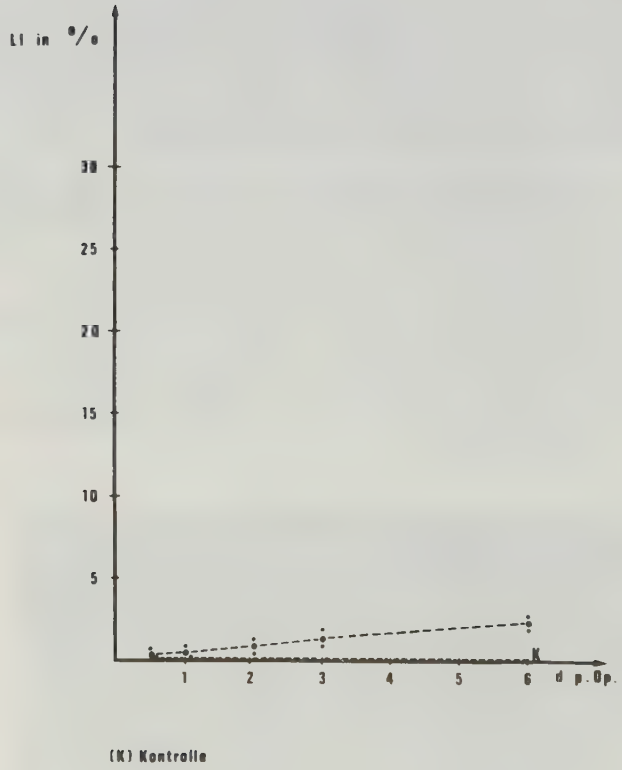


Abb. 17 : arithmetisches Mittel der Markierungsindices des Knorpels mit dem Standardfehler des Mittelwertes

12 Std.	1 d.	2 d.	3 d.	6 d.
0,14% ± 0,07%	0,26% ± 0,01%	0,94% ± 0,21%	1,22% ± 0,15%	2,15% ± 0,45%

Tabelle 7 : Wertetabelle zu Abbildung 17

In diesem Bereich konnten 12 Stunden, 1 und 2 Tage post Op. keine markierten Chondrozyten nachgewiesen werden. Am 3. Tag post Op. stieg der Markierungsindex auf 3,39% an und erreichte am 6. postoperativen Tag mit 4,36% sein Maximum.

Der gesamte nach Resektion erhaltene Knorpel zeigte,bei einem physiologischen Wert von 0,13%, einen stetigen Anstieg des Markierungsindex (siehe Abb. 17). 12 Stunden post Op. lag der Index bei 0,14% ± 0,07%. Nach dem 1. postoperativen Tag wurden 0,26% ± 0,01%, nach dem 2. Tag 0,94% ± 0,21% und nach dem 3. Tag 1,22% ± 0,15% errechnet. Das Maximum wurde nach 6 Tagen mit 2,15% ± 0,45% erreicht. Dieser Index am 6. Tag lag um das 15-fache höher, als der Wert 12 Stunden post Op.

Eine Konzentrierung von markierten Knorpelzellen in einem bestimmten Sektor des Knorpelringes konnte, mit Ausnahme in dem Teil, der an den Paries membranaceus angrenzt, nicht festgestellt werden. Auffällig war jedoch, daß die unmittelbar unter dem Perichondrium liegenden Knorpelschichten - von WATZKA und BARGMANN als perichondrale Knorpelzone bezeichnet - eine verstärkte Mitoseaktivität in Form eines hohen Markierungsindex aufwiesen. Es konnten aber auch Teilungsfiguren von Knorpelzellen in anderen Arealen nachgewiesen werden (siehe Abb. 18).

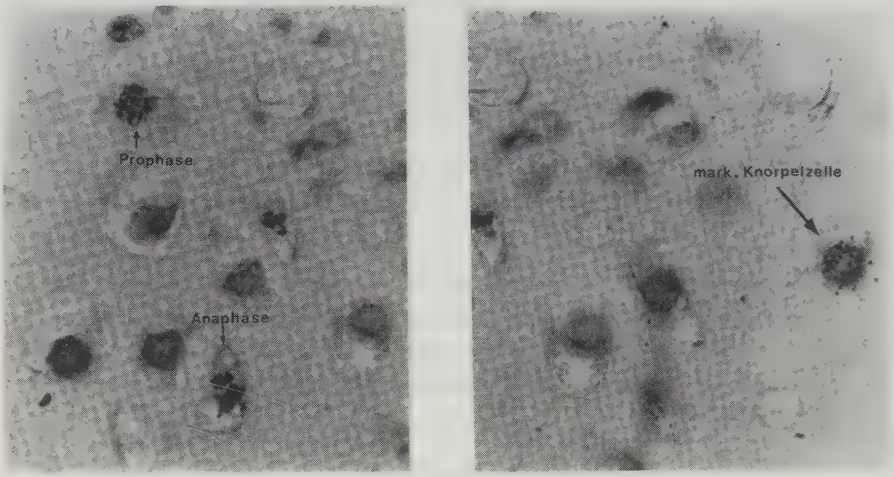


Abb. 18 : markierte, zentral gelegene Knorpelzelle, Prophase - und Anaphasestadium einer Knorpelzelle; 6 d. p. Op.; Feulgen; 920-fach

6. ZUSAMMENFASSUNG DER BEFUNDE

Operativ gesetzte Fensterdefekte werden vollständig verschlossen. Alle histologischen Gewebefraktionen des Trachealringes beteiligen sich am Verschluß des Defektes (siehe Abb.19).

Nach 12 Stunden bzw. einem Tag liegt eine leukozytäre Infiltration im Defektbereich vor. Am 3. postoperativen Tag wird bei einem maximalen Markierungsindex des Bindegewebes von 22,53% eine Bindegewebsbrücke mit neugebildeten Kapillaren beobachtet. 6 Tage nach Defektsetzung verbindet eine zell- und gefäßarme kollagene, bindegewebige Narbe die resezierten Knorpelstümpfe.

Das defektnahe Restepithel zeigt bereits 12 Stunden nach Operation einen Anstieg des Markierungsindex auf 11,91% gegenüber dem physiologischen Wert von 2,51%. Am 2. Tag liegt die höchste Aktivität bei 30,57%. 48 Stunden nach Defektsetzung können an den Defekträndern vereinzelt liegende, kubisch geformte Epithelzellen gesehen werden. Dieses Epithelregenerat erreicht mit 21,8% am 3. postoperativen Tag seinen höchsten Wert. Dabei wird der Defektbereich vollständig von einer 2- bis 3- lagigen Epithelschicht ausgekleidet. Unter diesem regenerierten Epithel ist jedoch keine Basalmembran nachweisbar. Am 6. Tag liegt der Markierungsindex des Regenerats mit 4,55% doppelt so hoch, wie der Index des nach Defektsetzung verbliebenen Restepithels.

Der Markierungsindex der Lamina propria zeigt ebenfalls einen steilen Anstieg vom physiologischen Wert 1,5% auf 10,7% nach 24 Stunden und auf 17,4% nach 48 Stunden. Am 6.Tag wurde mit 2,34% annähernd die Mitoseaktivität des physiologisch proliferierenden Gewebes erreicht. An den Schnittstellen der Defektzone zeigt sich eine keilförmige Verdickung mit vermehrter Vaskularisierung.

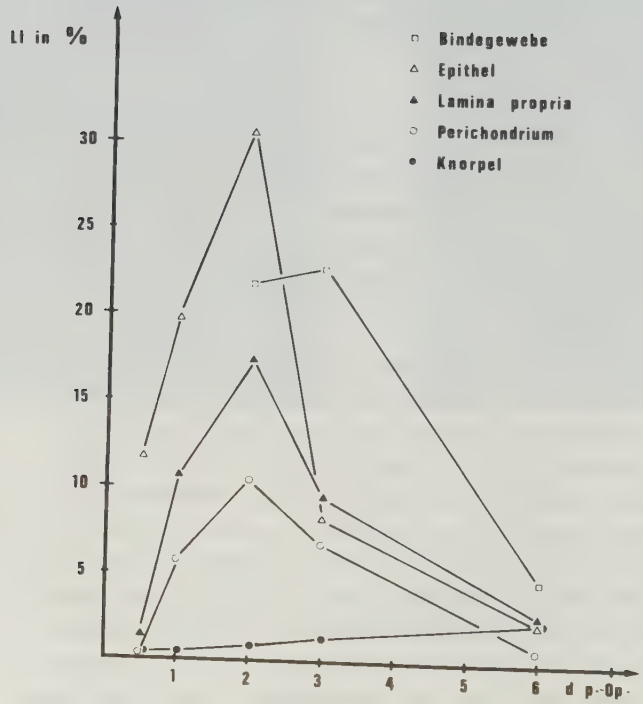


Abb. 19 : Markierungsindices aller histologischen Fraktionen des Trachealringes

Das Perichondrium zeigt als Umhüllung der Knorpelspange, neben dem Knorpel, die geringsten Markierungsindices. Der physiologische Index von 0,39% erfährt eine Steigerung auf 5,78% am 1. postoperativen Tag. Am 2. Tag liegt das

Maximum bei 10,4%. 6 Tage post Op. wurde annähernd der physiologische Wert erreicht. Eine geringgradig vermehrte Markierung des Perichondriums wird in der Nähe der Schnittstellen im Defektbereich angetroffen.

Der nach Resektion erhaltene Knorpel weist,im Gegensatz zu allen anderen Gewebefraktionen, einen mäßigen Anstieg und die geringsten Spitzen der Markierungsindices auf. Der physiologische Wert von 0,13% wird auch noch nach 12 Stunden post Op. beibehalten.Ein linearer Anstieg der Proliferationsaktivität führt schließlich am 6. Tag zu einem Wert von 2,15%. Eine verstärkte Chondrozytenmarkierung ist direkt an dem Paries membranaceus nachweisbar. Dort werden 12 Stunden, 1 und 2 Tage nach Defektsetzung keine Zellmarkierungen gefunden. Jedoch am 3. Tag findet sich in diesem Bereich ein Index von 3,39%, der am 6. postoperativen Tag sogar noch eine Steigerung auf 4,36% erfährt.

7. DISKUSSION DER BEFUNDE

7.1. Zellproliferation des Trachealringes unter physiologischen Bedingungen

Alle untersuchten Zellpopulationen der Trachea, wie Epithel, Bindegewebe, Perichondrium und Knorpel weisen physiologische Markierungsindices auf, die in ihrer Höhe beträchtliche Unterschiede zeigen.

Das Epithel, das nach einer Einteilung von BIZZOZERO den labilen Elementen mit erhöhter Mitoseaktivität zugerechnet wird, weist bei einem Markierungsindex von 2,51%, eine deutliche, physiologisch größere Wachstumstendenz auf, als der Knorpel, mit einem Index von 0,1%, den SCHAFFER den stabilen Gewebeelementen, ohne jede mitotische Potenz, zurechnet. Lediglich dem lockeren Bindegewebe ist, übereinstimmend mit Beobachtungen von SCHULTZE und OEHLERT, sowie von MESSIER und LEBLOND am erwachsenen Tier, ein deutlich höherer Markierungsindex von 4,9% eigen.

KVINNSLAND untersuchte mit H^3-Thymidin-Markierung das Wachstum des Nasenseptumknorpels von 1 bis 21 Tage alten Ratten. Es ergeben sich unterschiedliche Intensitäten der Zellproliferation zu verschiedenen Entwicklungszeiten. KVINNSLAND macht für diesen Unterschied die Wirkung von Wachstumshormonen verantwortlich.

Vergleichbare autoradiographische Daten für das physiologische Wachstum des Trachealepithels geben BINDREITER, SCHUPPLER und STOCKINGER an. Sie fanden bei der 10 Tage alten Ratte einen Markierungsindex von 2,0% bis 3,0%. Dabei zeigte sich bei der Analyse der Indices, daß nur die basal liegenden Zellformen teilungsfähig sind, während bei den weiter oberflächlich gelegenen Zellen eine mitotische Teilungsfähigkeit ausgeschlossen werden kann. Ähnliche Markierungsindices für das physiologische Wachstum

des Trachealepithels von erwachsenen Ratten fanden MEYER zum GOTTESBERGE und KOBURG mit Werten von 1,5% bis 2,2%. BLENKINSOPP gibt als physiologischen Index 1,1% an. SHORTER fand, bei einem durchschnittlichen Markierungsindex von 1,2%, eine Beschränkung der markierten Epithelzellen auf die basal gelegenen Epithelanteile. Die gleichen Beobachtungen machten MESSIER und LEBLOND. Sie berichten, bei einer wesentlich geringeren Proliferationsaktivität, in Höhe von 0,4% bis 0,5%, auch über vereinzelte, oberflächlich gelegene markierte Zellen.

7.2. Quantitativer und temporärer Verlauf des Markierungsindex nach Proliferationsreiz

Die Spitzen der Zellproliferation werden bei allen histologischen Gewebefraktionen des Trachealringes, mit Ausnahme von Bindegewebe und Knorpel, 2 Tage nach Defektsetzung erreicht.

Die Lamina propria und das, die resezierten Knorpelstümpfe verbindende, gefäßarme Bindegewebe erreichen ihre höchsten Markierungsindices, von 17,4% und 22,53%, am 2. und 3. postoperativen Tag. Auffällig war, daß in den ersten 12 Stunden das Bild der Bindegewebsproliferation von der leukozytären Infiltration verdeckt wurde, und somit keine exakte histologische Auswertung möglich war. Bereits die physiologische Proliferationsaktivität führt bei diesen beiden Gewebefraktionen, aufgrund ihrer geringen Zelldifferenzierung unter den Bindegewebsarten, nach von KORFF, zu hohen Werten. LINDNER et al. fanden bei autoradiographischen Untersuchungen an verschiedenen Bindegewebsarten bei erwachsenen Tieren, einen raschen Beginn der Regeneration nach Proliferationsreiz innerhalb der ersten 24 Stunden. Maximale Markierungsindices geben LINDNER et al. 2 Tage post Op. an. Neben mehreren Faktoren, die für das Regenerationsverhalten verantwortlich sind, scheint besonders das junge Alter der

Tiere den raschen Verlauf der Regeneration des Bindegewebes zu beeinflussen.

12 Stunden post Op. zeigt das Epithel mit 11,92% schon einen deutlichen Anstieg des Markierungsindex gegenüber der physiologischen Proliferationsaktivität von 2,51%. Es erreicht unter allen Gewebefraktionen einen quantitativ hohen Regenerationsverlauf, mit dem steilsten Proliferationsanstieg. Mit einem Markierungsindex von 30,57%, 2 Tage nach Defektsetzung, weist es unter den Gewebefraktionen der Trachea die höchsten Spitzen auf.

GORDON und LANE berichten über eine maximale Anzahl mitoseaktiver Zellen des Trachealepithels bei erwachsenen Ratten, 23 Stunden nach Defektsetzung, mit einem Index von 41,2%. Dabei geben auch sie an, daß nach der Zerstörung von oberflächlichem Trachealepithel, in erster Linie, die basalständigen Epithelzellen Markierungen erkennen lassen. Jedoch beginnt, bei GORDON und LANE, der Anstieg der DNS-Synthese erst 14 Stunden nach Defektsetzung. Die geringe und oberflächliche Läsion des Epithels führt bei erwachsenen Tieren zu einer gesteigerten DNS-Synthese, von nur 16 Stunden (GORDON und LANE).

Das, den Knorpel unscharf begrenzende, Kollagenfasern enthaltende Bindegewebe, das Perichondrium, liegt mit seinem maximalen Markierungsindex von 16,4% am 2. postoperativen Tag, um das 30-fache höher, als der physiologische Kontrollwert von 0,5%.

TONNA und CRONKITE untersuchten das Regenerationsverhalten des Femurperiosts nach Fraktur mit autoradiographischen Verfahren, nach ^{3}H-Thymidin Einbau. Der zeitliche Verlauf des regenerativen Verhaltens des Periosts entspricht dabei dem Wachstumsanstieg des Perichondriums der Trachea. Bei jungen Tieren liegt, ihren Beobachtungen zufolge, der Proliferationsbeginn des Periosts 8 Stunden nach Traumatisierung. 32 Stunden nach Setzung der Fraktur erreicht der Markierungs-

index sein Maximum. Erwachsene Tiere weisen die größte Proliferation erst nach 4 Tagen auf.

Das regeneratorische Reaktionsvermögen des Knorpels nach Proliferationsreiz ist, entsprechend seiner weit fortgeschrittenen Differenzierung unter den Geweben der Trachea, verzögert und gering. Nach BÜCHNER ist diese hohe Zelldifferenzierung mit einem Rückgang der mitotischen Vermehrungsfähigkeit verbunden. Ein rascher Start des Regenerationsverlaufs mit hohen Spitzen und nachfolgendem steilen Abfall, wie er bei allen anderen Gewebsarten der Trachea beobachtet wird, ist beim Knorpel nicht zu ermitteln. Jedoch erfolgt über den ganzen Beobachtungszeitraum eine langsame, kontinuierliche Steigerung der Markierungsindices. Das Maximum dieser Markierungsindices liegt aber mit 2,15% am 6. postoperativen Tag deutlich niedriger, als das Maximum der übrigen histologischen Gewebefraktionen der Trachea, die teilweise wie das Epithel, maximale Werte bei 30% aufweisen.

7.3. Regeneration des Trachealringes

Der hohe quantitative Anstieg der Markierungsindices aller histologischen Gewebefraktionen des Trachealringes, nach experimentellem Proliferationsreiz, zeigt, daß alle Gewebe zur Bildung eines Zellregenerates befähigt sind.

Eine beschleunigte regenerative Zellneubildung, die sowohl vom Bindegewebe der Adventitia, als auch von der Lamina propria ausgeht, führt bereits am 3. postoperativen Tag zu einem Defektverschluß der, an den Paries membranaceus sich anschließenden Knorpelenden, durch zellreiches, gut vaskularisiertes Bindegewebe.

Das, diesem Bindegewebe aufliegende, neugebildete Epithel besteht aus flachen, niedrigzylindrischen Zellen (BÜCHNER),

die ihm eine metaplastische Erscheinung verleihen. Das regenerierte Epithel unterliegt dabei einer starken Zellvermehrung, in Form erhöhter Markierungsindices. Sein Maximum erreicht es am 3. postoperativen Tag, mit einem Markierungsindex von 21,8%. Nach weiteren 3 Tagen fällt der Index auf 4,5% ab, und liegt mit diesem Wert annähernd in dem Bereich der physiologischen Wachstumsaktivität. Das Epithel antwortet somit auf den Regenerationsreiz mit einem kurzzeitigen, intensiven Wachstum. Eine Basalmembran, dem das Epithel normalerweise aufsitzt, ist unter dem regenerierten Epithel des Trachealringes nicht nachweisbar.

Das innere und äußere Perichondrium umhüllt den, aus hyalinem Knorpel bestehenden, Trachealring. Eine vermehrte Markierung der inneren chondrogenetischen Lagen (HAM) des Perichondriums spricht für eine Knorpelneubildung, durch appositionelles Wachstum. Diese erhöhte Proliferationsaktivität des Perichondriums fördert die Teilung und Differenzierung der, am Knorpel angrenzenden, Perichondralzellen. Auch die unmittelbar darunter liegende Knorpelschicht scheint nach Proliferationsreiz einer verstärkten Mitoseaktivität zu unterliegen. SILBERMANN und FROMMER sehen in dieser Schicht die Chondroblasten, deren weitere Entwicklung zu Chondrozyten noch stattfindet. Diese Knorpelschicht ist, nach HAM, beim wachsenden Tier noch breit, und am äußeren Perichondrium verdickt. Sie kann beim wachsenden Trachealknorpel als Übergangslage zu den knorpelerzeugenden Schichten des Perichondriums angesehen werden. SKOOG, SOHN und OHLSEN stellen bei 2 bis 4 Monate alten Ratten fest, daß ohne Perichondrium keine Knorpelneubildung möglich ist.

Der Trachealknorpel selbst zeigt, aufgrund seines hohen Differenzierungsgrades, wenig Regenerationsvermögen. PIRSIG und LEHMANN finden bei Kindern 1 1/2 Jahre nach Fraktur des Nasenseptums, trotz Regeneration an den Defektenden, keine homogene Regeneration des hyalinen Knorpels. Die Verbindung zwischen den Knorpelenden wird, entsprechend den Ergebnissen

dieser Arbeit, durch Bindegewebe hergestellt.

Nach SCHAFFER sind Fibroblasten , durch eine Umwandlung in Chondroblasten, zu einer Bildung von Faserknorpel, als Vorläufer des Hyalinknorpels, befähigt. Bei keinem unserer Präparate konnte,durch Färbung der Knorpelgrundsubstanz mit Alcianblau, eine Darstellung fibrillärer Strukturen beobachtet werden. Das,am 3. postoperativen Tag vorhandene, mitoseaktive Bindegewebe zeigt aber am 6. Tag nur noch vereinzelt Fibroblasten und überwiegend kollagene Faseranteile. LUFTI findet eine vollständige Regeneration des hyalinen Knorpels der Tibiaepiphyse beim Hahn, die durch Differenzierung des Granulationsgewebes zustande kommt.

8. Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wird das Regenerationsvermögen der einzelnen histologischen Fraktionen des Trachealringes, nach iatrogener Traumatisierung der wachsenden Trachea , an der Albinoratte, vom Inzuchtstamm Wistar, untersucht.

Es werden unter mikrochirurgischen Bedingungen Fensterdefekte unterschiedlicher Größe und Lokalisation an der Trachea gesetzt. Mit H^3markiertem Thymidin wurde das Regenerationsverhalten von Bindegewebe, Epithel, Tunica propria, Perichondrium und Knorpel zellkinetisch, als Funktion der Zeit, untersucht.

Folgende Schlußfolgerungen lassen sich ziehen :

1. An der Regeneration der Fensterdefekte sind alle Gewebefraktionen des Trachealringes beteiligt.
2. Das Epithel zeigt mit über 30% die höchsten Markierungsindices, gefolgt vom Bindegewebe, das jedoch eine längere Proliferation aufweist. Das Perichondrium hat tiefere Proliferationswerte.
3. Der Knorpel der Trachea weist die niedrigsten Markierungsindices auf.
4. Das Maximum der regeneratorischen Aktivität aller histologischen Fraktionen, mit Ausnahme von Knorpel und Bindegewebe, liegt, gemessen am Maximum der Markierungsindices bei 48 Stunden nach Defektsetzung.
5. Die regeneratorische Leistung des Knorpels steigt langsam und kontinuierlich bis zum 6. postoperativen Tag.

Im Tierexperiment ist die Regeneration der wachsenden Trachea nach ihrer Traumatisierung,als Funktion der Zeit, nachgewiesen.

Die Untersuchungen legen dar, daß, nach experimenteller Setzung von Fensterdefekten, alle histologischen Fraktionen des Trachealringes am Defektverschluß, mit unterschiedlicher Potenz, beteiligt sind. Das Epithel weist die höchsten regenerativen Fähigkeiten auf, der Knorpel die geringsten. Ein vollständiger Defektverschluß durch Knorpelbildung findet jedoch nicht statt. Eine Stenosierung im Defektbereich tritt in dem beobachteten Zeitraum nicht auf.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ABOULKER, P.
J.E. DEMALDENT
J.M. PELISSE
Un cas de réparation d'une amputation totale de la trachée cervicale.
Ann. Otolaryngol. Chir. Cervivofac. 91, 531 - 6 (1974)

ARNOLD, M.
Histochemie, Einführung in Grundlagen und Prinzipien der Methoden.
Berlin, Heidelberg, New York (1968)

BANFAI, J.
Chirurgische Beseitigung der durch Knorpeldefekt bedingten Trachealstenose.
Z. Laryng. Rhinol. 41, 552 - 9 (1962)

BARGMANN, W.
Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.
Thieme (Stuttg.) Bd. II (1977)

BARGMANN, W.
Zur Kenntnis der Knorpelarchitekturen.
Ztschr. Zellforschung 29, 405 - 424 (1939)

BECK, CHL.
G. LANGE
Resektion von narbigen Strikturen der zervikalen Trachea.
Z. Laryng. Rhinol. 50, 434 - 442 (1971)

BENNINGHOFF, A.
Der funktionelle Bau des Hyalinknorpels.
Ergebn. Anatom. Entw. Gesch. 26, 1 - 54 (1925 b)

BINDREITER, M.
J. SCHUPPLER
L. STOCKINGER
Zellproliferation und Differenzierung im Trachealepithel der Ratte.
Exp. Cell Res. 50, 377 - 382 (1968)

BIZZOZERO, G.
Wachstum und Regeneration im Organismus.
Med. Wochenschr. Wien, 696 - 744 (1894)

BIZZOZERO, G. — An address on the growth and regeneration of the organism. Brit. med. J. 1, 728 - 732 (1894)

BLENKINSOPP, W.K. — Cell Proliferation In The Epithelium of The Oesophagus, Trachea And Ureter In Mice. J. Cell Sci. 5, 393 - 401 (1969)

BLENKINSOPP, W.K. — Effect of Tritiated Thymidine on Cell Proliferation. J. Cell Sci. 2, 305 - 308 (1967)

BLENKINSOPP, W.K. — Proliferation of the Respiratory Tract Epithelium In The Rat. Exp. Cell Res. 46, 144 -154 (1967)

BÜCHNER, F. — Allgemeine Pathologie und Ätiologie. 6. Aufl., München, Berlin, Wien (1975)

CONLEY, J.J. — Laryngo - tracheale Wiederherstellung. Z. Laryngol. Rhinol. Otol. 50, 693 - 722 (1971)

DEDO, H.H. N.H. FISHMAN — Laryngeal Release And Sleeve Resection For Tracheal Stenosis. Ann. ORL 78, 285 - 296 (1969)

DENECKE, H.J. — Unfallchirurgie des Gesichtes und Halses. Archiv f. klinische und experimentelle Ohren- Nasen- und Kehlkopfheilkunde 191, 217 -404 (1968)

FARRIOR, R.T. — Reconstructive Surgery Related To Laryngology. Ann. ORL 79, 1061 - 1075 (1970)

FLEMMING, J. K.W. HOMMERICH — Trachealstenoses. Development and the Latest State of Experimental Surgery. ORL 36, 179 - 190 (1974)

FOET, K. — Tierexperimentelle Untersuchungen zum Regenerationsverhalten der wachsenden Trachea nach ihrer Traumatisierung. Habil.-Schrift, Würzburg (1978)

GOLLMITZ, H. — Die Einteilung der Trachealstenosen und ihre operative Behandlung. Arch. klin. exp. Ohr.-, Nas.- u. Kehlk. Heilkunde 187, 742 - 746 (Kongreßbericht 1966)

GORDON, R.E., B.P. LANE — Cytokinetics of Rat Tracheal Epithelium Stimulated By Mechanical Trauma. Cell Tissue Kinet. 10, 171 - 181 (1977)

GRAHNE, B. — Operative Treatment Of Severe Chronic Traumatic Laryngeal Stenosis In Infants up To Three Years Old. Acta Otolaryng. 72, 134 - 143 (1971)

GREENE, E. — Anatomy of the Rat. Hafner Publishing Co. New York (1955)

GRILLO, H.C. — Resektion und Rekonstruktion der Trachea. Langenbecks Arch. Chir. 322, 869 - 886 (1968)

GRILLO, H.C. — Tracheal Reconstruction Indications and Techniques. Arch. Otolaryng. 96, 31 - 39 (1972)

GRILLO, H.C. — Surgery of the Trachea. Curr. Probl. Surg., 3 - 59 (1970)

HAM, A.W. — Histology. Philadelphia 1950

HALTTUNEN, P. S. MATTILA H. MEURALA — Tracheal Resection In The Treatment Of Tracheal Strictures. Ann. Chir. Gynaec. Fenniae 63, 358 - 363 (1974)

ILBERG, C. v. S. KITANO — Die Schleimhaut der Trachea nach Intubation. Arch. Ohr-, Nas- u. Kehlk. Heilk. 213, 460 (1976)

ILBERG, C. v.
S. KITANO
A. SCHMIDT
Das Cialitkonservierte Trachea-transplantat.
Z. Laryng. Rhinol. 56, 814 - 823 (1977)

JUNGQUEIRA, L.
J. CARNEIRO
A.N. Contopoulos
Basis Histology.
Los Altos, California 1975

KEIM, W.F.
Total Reconstruction of the cervical Trachea.
Arch. Otolaryng. 91, 501 - 504 (1970)

KLEINSASSER, O.
Narbenstenosen des Kehlkopfs und der Trachea.
HNO (Berl.) 19, 294 - 302 (1971)

KOBURG, E.
Autoradiographische Untersuchungen zur Zellneubildungsrate an den Epithelien des oberen Respirations- und Verdauungstraktes.
Arch. Ohr-, Nas.- u. Kehlk. Heilk. 80, 616 - 621 (Kongreßbericht 1962)

KORFF, v.
Die Regeneration des Knochenbruches, insbesondere die Differenzierung des lockeren Bindegewebes der Bruchstelle in Knorpel und Knochen.
Virchows Archiv 276, 113 (1930)

KORNMESSER, H.J.
Segmentresektion der Trachea im Kindesalter.
Z. Laryng. Rhinol. 53, 395 - 398 (1974)

KORNMESSER, H.J.
Tierexperimentelle Untersuchungen mit Reimplantationen kompletter Trachealsegmente.
Arch. klin. exp. Ohr.-, Nas.- u. Kehlk. Heilk. 196, 354 (1970)

KUP, W.
Erfahrungen mit der Beurteilung und Behandlung reanimationsbedingter Kehlkopf- und Trachealstenosen.
Mschr. Ohr. Hk., Wien 108, 445 - 453 (1974)

KUP, W.
Möglichkeiten und Resultate der Behandlung narbiger Kehlkopf- und Trachealstenosen.
HNO-Praxis 4/1, 433 - 436 (1976)

KVINNSLAND, ST.
Regional Variations In Cell Proliferation And Matrix Formation In The Cartilaginous Nasal Septum Of The Rat.
(2 H) - Thymidine And (35 S) - Sulfate Incorporation Studies.
Growth, 41, 85 - 93 (1977)

LESOINE, W.
Ein Beitrag zur End-zu-End-Anastomose bei Trachealresektionen im cervikalen Bereich.
Arch. klin. exp. Ohr-, Nas.- u. Kehlk. Heilk. 205, 312 - 313 (1973)

LINDNER, J.
G. FREYTAG
Z. YURUKOWA
G. BESTE
Quantitative und qualitative Bestimmungen der Regeneration von Bindegewebe.
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 49 - 50, 286 - 293 (1965 - 1966)

LUFTI, A.M.
The germinal zone of the growth cartilage at the upper ends of the tibia and fibula in Gallus domesticus.
J. Anat. 106, 565 - 576 (1970)

MAEDA, M.
H.C. GRILLO
Tracheal growth following anastomosis in puppies.
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 64, 304 - 313 (1972)

MAEDA, M.
H. GRILLO
Effect of tension on tracheal growth after resection and anastomosis in puppies.
J. thorac. cardiovasc. Surg. 65, 658 - 668 (1973)

MESSIER, B.
C.P. LEBLOND
Cell Proliferation and Migration as Revealed by Radioautography after Injection of Thymidine - H3 into Male Rats and Mice.
Ann. J. Anat. 106, 247 - 265 (1960)

MEYER zum GOTTES-BERGE, A.
E. KOBURG
Autoradiographische Untersuchungen zur Zellneubildung im Respirationstrakt, in der Tube, im Mittelohr und äußeren Gehörgang.
Acta Oto-laryng. 56, 353 - 361 (1963)

MOSER, F.
Rekonstruktionsplastik nach Querresektion der zervikalen Trachea.
HNO-Praxis 4/1, 450 - 452 (1976)

NAUMANN, H.H.
Rekonstruktive Möglichkeiten bei laryngo - trachealen Stenosen.
Münch. med. Wschr. 116, 465 - 472 (1974)

NAUMANN, W.H.
K. IBE
M. MÜNZEL
L. SCHMID-STEIN
Komplikationen der Tracheotomie bei unterschiedlichen Erkrankungen.
Z. Laryng. Rhinol. 49, 154 - 167 (1970)

NORDIN, U
The Trachea and Cuff-Induced Tracheal Injury.
An experimental study on causative factors and prevention.
Acta Oto-Laryng. 345 (1977)

PETERSEN, H.
Histologie I.
München, Wiesbaden 1922

PIRSIG, W.
J. LEHMANN
The influence of trauma on the growing septal cartilage
Z. Laryng. Rhinol. 13, 39 - 46 (1975)

ROB, C.
L.L. BROMLEY
Reconstruction of The Trachea.
Thorax, 8, 269 - 273 (1953)

ROMEIS, B.
Mikroskopische Technik.
Oldenbourg Verlag München - Wien (1968) 16. Auflage

SCHAFFER, J.
Über den feineren Bau und die Entwicklung des Knorpelgewebes und über verwandte Formen der Stützsubstanzen.
Z.w.Z. 80, II. Teil (1897)

SCHAFFER, J. — Die Stützgewebe im Handbuch mikrosk. Anatomie des Menschen. II / 2., 1 - 300, Berlin 1930

SCHLOSSHAUER, B. — Zur Verhütung und Behandlung von Kehlkopf- und Luftröhrenstenosen im Kindesalter. HNO (Berl.) 342 - 344 (1975)

SCHULTZE, B. — Die Orthologie und Pathologie des Nukleinsäurestoffwechsels der Zellen im Autoradiogramm. Handbuch der Allgem. Pathologie II, Teil 5, 466 - 667, Berlin, Heidelberg, New York (1968)

SCHULTZE, B.
W. OEHLERT — Autoradiographic investigation of incorporation of H^3- thymidine into cells of the rat and mouse. Science, 131, 737 - 738 (1960)

SHORTER, R.G.
J.L. TITUS
M.B. DIVERITE — Cytodynamics in the respiratory tract of the rat. Thorax 21, 32 - 37 (1966)

SIEGENTHALER, W. — Klinische Pathophysiologie. 3. Aufl., Thieme (1975)

SILBERMANN, M.
J. FROMMER — Ultrastructure of developing cartilage in the mandibular condyle of the mouse. Acta anat. 90, 330 - 346 (1974)

SKOOG, T. — Plastic Surgery. Stockholm, Stuttgart 1974

SKOOG, T.
L. OHLSEN
S.A. SOHN — Perichondrial potential for cartilage regeneration. Scand. J. Plast. Reconstr. Surgery 6, 123 - 125 (1972)

SOHN, S.A.
L. OHLSEN — Growth of cartilage from a free perichondrial graft placed across a defect in a rabbit's trachea. Plast. reconstr. Surg. 53, 55 - 60 (1974)

SØRENSEN, H.R.
J. MOESNER
P.A. NIELSEN
Influence of growth upon the development of stenosis following experimental resections of the trachea in puppies.
Scand. J. Thor. Cardiovasc. Surg. 5, 202 - 205 (1971)

SPERLING, E.
Zur operativen Behandlung längerer organischer Trachealstenosen.
Der Chirurg 37, 529 - 534 (1966)

TONNA, E.A.
E.P. CRONKITE
Autoradiographic studies of cell proliferation in the periosteum of infact and fractured femora of mice utilizing DNA labelling with H_3- thymidine.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107, 719 (1961)

TONNA, E.A.
E.P. CRONKITE
Cellular response to fracture studied with tritiated thymidine.
J. Bone Joint Surg. 43/A, 352 (1961)

TONNA, E.A.
E.P. CRONKITE
The periosteum: Autoradiographic studies on cellular proliferation and transformation utilizing tritiated thymidine.
Clin. Orthop. Rel. Res. 30, 218 (1963)

WATZKA, M.
Kurzlehrbuch der Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen.
Stuttgart 1957

WEERDA, G.H.
L. GRÜNTJENS
TH. KARNAHL
H.J. STREIT
Resorbierbares und nicht resorbierbares Nahtmaterial in der Trachealchirurgie.
Eine tierexperimentelle Studie.
Arch. klin. exp. Ohr-, Nas.- u. Kehlk. Heilk. 203, 115 - 124 (1972)

ZEHM, S.
Zur Problematik der kindlichen Tracheastenose und ihre operativplastische Versorgung.
HNO (Berl.) 24, 138 - 142 (1976)

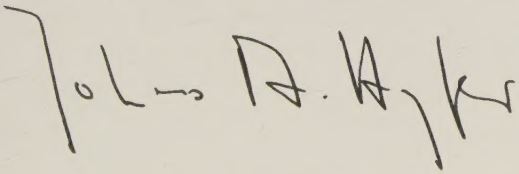
ZENKER, R.
A. SCHAUDIG
Gegenwärtiger Stand der Resektion von Trachea und Bronchien.
Münch. Med. Wschr. 114, 1090 - 1094 (1972)

L E B E N S L A U F

Am 7.7.1952 in Wullenstetten, Kreis Neu-Ulm, geboren

Vater	Anton Hupfer, Kaufmann
Mutter	Lore Hupfer, geb. Sauter
1958 - 1962	Volksschule in Wullenstetten
1962 - 1969	Humanistisches Gymnasium in Weißenhorn
1969 - 1970	Dossenberger Gymnasium in Günzburg
1970 - 1972	Albertus Magnus-Gymnasium in Rottweil
22.6.1972	Abitur
1972 - 1973	Praktikum am Psychiatrischen Landeskrankenhaus in Weinsberg
1973 - 1974	Wehrpflicht
1974 - 1980	Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
12.5.1980	Bestallung als Arzt
Ab 13.5.1980	Stabsarzt am Bundeswehrkrankenhaus in Ulm

Würzburg, den 13. August 1980



Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80